

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-79982

(43) 公開日 平成9年(1997)3月28日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 21/65			G 0 1 N 21/65	
33/483			33/483	C
33/487			33/487	

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願平7-262338

(22) 出願日 平成7年(1995)9月13日

(71) 出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 王 かおる

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 寶 曉囀

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(74) 代理人 弁理士 野口 繁雄

(54) 【発明の名称】 体液中成分の光学的同時測定方法

(57) 【要約】

【課題】 ラマン分光法を利用した、短時間で、直接的に、体液中の複数成分を同時に定性・定量でき、消耗品も不要な測定方法を提供すること。

【解決手段】 測定しようとする体液中の各成分についてその単成分水溶液の濃度とそのラマンスペクトル強度との間の相関が良好な波数をその成分に固有の測定波数として選択し、体液試料に対しラマン励起光を照射し、測定しようとする複数の各体液中成分についてそれぞれの測定波数でのラマンスペクトル強度を測定するか、又は任意の波数範囲の複数の波数におけるラマンスペクトル強度を測定する。各成分について予め作成した検量線を利用して体液中の各成分を同時に定性・定量分析したり、多変量回帰分析による演算処理により他成分の干渉を抑えて各成分を同時に定性・定量分析することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 測定しようとする体液中の各成分について、その成分の濃度とラマンスペクトル強度との相関が良好な波数をその成分固有の測定波数として予め選択し、

体液試料に対しラマン励起光を照射し、測定しようとする各成分についてのそれぞれの測定波数でのラマンスペクトル強度又はそれぞれの測定波数範囲でのラマンスペクトル積算強度を測定し、

各成分についてそれぞれの測定波数でのラマンスペクトル強度又はそれぞれの測定波数範囲でのラマンスペクトル積算強度とその成分の濃度について予め作成した検量線を利用し、体液中の各成分を同時に定性・定量分析することを特徴とする測定方法。

$$R^2 = \frac{\left\{ \sum_{i=1}^n [(x_i - X)(y_i - Y)] \right\}^2}{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - X)^2 \right] \left[\sum_{i=1}^n (y_i - Y)^2 \right]}$$

x_i : 体液中成分の各点の濃度

y_i : x_i に対するラマンスペクトル強度

X : 体液中成分の各点の濃度の平均値

Y : ラマンスペクトル強度の平均値

【請求項 4】 測定しようとする体液成分として、アルブミン、グロブリン、ヘモグロビン、グルコース、アセト酢酸リチウム、 β -ヒドロキシ酪酸、アセトン、ジタウロビリルビン、ウロビリルビン、亜硝酸ナトリウム、尿素、尿酸、葉酸、アスコルビン酸、ビタミン B₂、クレアチン 1 水和物、クレアチニン、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ及びアンモニアのうちの少なくとも 1 成分を含み、各成分の測定波数又は測定波数範囲は、アルブミンに対しては 590~650 cm^{-1} 付近、800~860 cm^{-1} 付近、2342~2402 cm^{-1} から選択し、グロブリンに対しては 158~218 cm^{-1} 付近、402~462 cm^{-1} 付近、623~683 cm^{-1} 付近、807~867 cm^{-1} 付近、822~862 cm^{-1} 付近、1353~1413 cm^{-1} 付近、1562~1622 cm^{-1} 付近、1847~1907 cm^{-1} 付近、2095~2155 cm^{-1} 付近、2340~2400 cm^{-1} 付近、2403~2463 cm^{-1} 付近から選択し、ヘモグロビンに対しては、807~867 cm^{-1} 付近、893~953 cm^{-1} 付近、1353~1413 cm^{-1} 付近、1562~1622 cm^{-1} 付近、1840~1900 cm^{-1} 付近、2095~2155 cm^{-1} 付近、2340~2400 cm^{-1} 付近、2403~2463 cm^{-1} 付近から選択し、グルコースに対しては、200~554 cm^{-1} 付近、810~944 cm^{-1} 付近、2590~2940 cm^{-1} 付近から選択し、アセト酢酸リチウムに対しては、799~859 cm^{-1} 付近、1353~1413 cm^{-1} 付近、1840~1900 cm^{-1} 付近、2347~2407 cm^{-1} 付近、2907~2967 cm^{-1} 付近から選択し、 β -ヒドロキシ酪酸に対しては、1420~1480 cm^{-1} 付

【請求項 2】 体液試料に対しラマン励起光を照射し、測定しようとする体液中の複数の各成分の濃度とラマンスペクトル強度との相関が良好な波数を各成分固有の測定波数としてそれらの測定波数でのラマンスペクトル強度を測定し、又は任意の波数範囲の複数の波数におけるラマンスペクトル強度を測定し、

多変量回帰分析により体液試料中の複数の成分を同時に定性・定量分析することを特徴とする測定方法。

【請求項 3】 各成分の濃度とラマンスペクトル強度との相関が良好な波数は、相関係数 R^2 が 0.8 以上、好ましくは 0.9 以上の波数である請求項 1 又は 2 に記載の測定方法。ただし、相関係数 R^2 は次の式により算出される値である。

【数 1】

近、1557~1617 cm^{-1} 付近、1600~1660 cm^{-1} 付近、2870~2971 cm^{-1} 付近から選択し、

アセトンに対しては、775~845 cm^{-1} 付近、1050~1110 cm^{-1} 付近、1207~1267 cm^{-1} 付近、1399~1459 cm^{-1} 付近、1680~1740 cm^{-1} 付近、2911~2971 cm^{-1} 付近から選択し、

ジタウロビリルビンに対しては、927~987 cm^{-1} 付近、1233~1293 cm^{-1} 付近、1586~1616 cm^{-1} 付近から選択し、

ウロビリルビンに対しては、332~2900 cm^{-1} から任意の位置を選択し、

亜硝酸ナトリウムに対しては、783~843 cm^{-1} 付近、1318~1378 cm^{-1} 付近から選択し、

尿素に対しては、501~561 cm^{-1} 付近、567~627 cm^{-1} 付近、978~1048 cm^{-1} 付近、1033~1093 cm^{-1} 付近、1138~1198 cm^{-1} 付近、1583~1643 cm^{-1} 付近から選択し、

尿酸に対しては、640~700 cm^{-1} 付近から選択し、

葉酸に対しては、631~691 cm^{-1} 付近、816~876 cm^{-1} 付近、901~961 cm^{-1} 付近、1355~1415 cm^{-1} 付近、1562~1622 cm^{-1} 付近、1847~1907 cm^{-1} 付近、2093~2153 cm^{-1} 付近、2339~2399 cm^{-1} 付近、2400~2460 cm^{-1} 付近から選択し、

アスコルビン酸に対しては、800~860 cm^{-1} 付近、1673~1733 cm^{-1} 付近、2919~2979 cm^{-1} 付近から選択し、

ビタミン B₂ に対しては、404~464 cm^{-1} 付近、626~686 cm^{-1} 付近、798~858 cm^{-1} 付近、860~920 cm^{-1} 付近、1317~1377 cm^{-1} 付近、1546~1606 cm^{-1} 付近、1834~1894 cm^{-1} 付近、2106~2166 cm^{-1} 付近、2360~2420 cm^{-1} 付近、2419~2479 cm^{-1} 付近から選択し、

クレアチン 1 水和物に対しては、800~860 cm^{-1} 付近、

1563~1623 cm^{-1} 付近から選択し、
クレアチニンに対しては、538~598 cm^{-1} 付近、580~640 cm^{-1} 付近、665~725 cm^{-1} 付近、817~877 cm^{-1} 付近、868~928 cm^{-1} 付近、1021~1081 cm^{-1} 付近、1550~1610 cm^{-1} 付近、2868~2900 cm^{-1} 付近、2900~2950 cm^{-1} 付近、2950~2996 cm^{-1} 付近から選択し、
 α -アミラーゼに対しては、393~453 cm^{-1} 付近、631~691 cm^{-1} 付近、792~852 cm^{-1} 付近、868~928 cm^{-1} 付近、1333~1393 cm^{-1} 付近、1546~1606 cm^{-1} 付近、1834~1894 cm^{-1} 付近、2334~2394 cm^{-1} 付近から選択し、
 β -アミラーゼに対しては、376~436 cm^{-1} 付近、622~682 cm^{-1} 付近、783~843 cm^{-1} 付近、868~928 cm^{-1} 付近、1334~1394 cm^{-1} 付近、1546~1606 cm^{-1} 付近、1834~1894 cm^{-1} 付近、2665~2725 cm^{-1} 付近から選択し、
アンモニアに対しては、3190~3250 cm^{-1} 付近、3292~3350 cm^{-1} 付近、3377~3437 cm^{-1} 付近から選択し、
イノシトールに対しては、404~464 cm^{-1} 付近、805~865 cm^{-1} 付近、1014~1074 cm^{-1} 付近、1438~1498 cm^{-1} 付近、2966~3026 cm^{-1} 付近から選択し、
ガラクトースに対しては、466~526 cm^{-1} 付近、835~895 cm^{-1} 付近、1032~1092 cm^{-1} 付近、1237~1297 cm^{-1} 付近、1332~1392 cm^{-1} 付近、1438~1498 cm^{-1} 付近、2946~3006 cm^{-1} 付近から選択し、
フルクトースに対しては、569~629 cm^{-1} 付近、772~832 cm^{-1} 付近、1044~1106 cm^{-1} 付近、1237~1297 cm^{-1} 付近、1438~1498 cm^{-1} 付近、2966~2996 cm^{-1} 付近から選択する請求項 1 から 3 のいずれかに記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は臨床検査の分野において、ラマン光を利用して体液（尿、血液、血清、血漿、唾液、汗など）中成分、例えばアルブミン、グロブリン、ヘモグロビン、グルコース、アセト酢酸リチウム、 β -ヒドロキシ酪酸、アセトン、ジタウロビリルビン、ウロビリル、亜硝酸ナトリウム、尿素などを同時に短時間で定性・定量測定する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】臨床検査において、体液中成分を測定する方法としては、試薬法、試験紙法、化学発光法、イムノアッセイ法、酵素法、クロマトグラフィー法などがある。

【0003】試験紙法で用いる試験紙は、セルロースに反応試薬を含ませた反応部分をプラスチックの支持体に接着剤などで固定し乾燥させたものが多い。反応部分は湿気を含むと試薬間で反応が起こり、また高温や光によっても変成して、感度が低下することが多いことから、試験紙を収納する容器は密閉し、高温を避けて保存

し、有効期限内に使用しなければならない。例えば尿検査の試験紙法はpH、タンパク質、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、細菌感染、比重などの項目について1分以内に同時に多項目の測定が可能であるが、試薬部分の反応は内因性の促進物質や阻害物質の他、反応温度や湿度などによっても影響を受け、しかも、半定量しかできない。試験紙法での判定法は主に比色法であり、その反応機構は酵素反応や、酸化還元反応などの化学反応が主である。試薬法では、指示薬や酵素・化学反応を介した比色法やタンパク測定に使用される比濁法が主である。

【0004】酵素法は被測定物質に特異性が高く、簡便であるが、体液自体が持つ色調により陽性反応を隠蔽する危険性があり、さらに、酸化還元反応を介している場合には内因性、外因性の種々の酸化、還元反応物質によって反応が抑制されたりすることがあり、偽陰性、偽陽性が見られる危険性がある。

【0005】しかし、いずれの方法も媒介反応を介して測定する間接測定法であるため、潜在的な誤差がある。概して比色法で判定を行う場合には、結果の判定に誤差が生じやすく、化学反応を介するものは特異性が低い。また、体液中にはこれらの検査に干渉する物質が多数存在するため、反応が阻害されたり、偽陽性反応を起こさせたり、陽性反応とは異なる色調を呈し、陽性反応を隠蔽してしまう。元来酵素を使用する系は不安定で、化学反応を介する系は共存物質の影響を受けやすい。また、検査項目の臨床的意義が相互に関連する場合（ビリルビンとウロビリノーゲン、タンパクと潜血、グルコースとケトン体）には、多項目の試験を同時に行い総合判定することが有用であるが、各項目の試験を個別に行うことは煩雑で、しかも、干渉物の影響を受けやすい。多項目試験紙は高価であることや、判定し難いことで敬遠されがちである。

【0006】試薬法、試験紙法及び酵素法では消耗品である試薬、試験紙片または酵素などが必要であり、また使用前の試薬等の保存安定性や使用後の廃棄の問題もある。さらに、試薬や試料の添加量など操作時のミスによる誤差が起こる可能性があり、操作も煩雑で、測定を目的としないアスコルビン酸などの他の成分により干渉作用を受けるという欠点もある。試薬法や酵素法では単成分での定量測定は可能であるが、同時に多成分の測定をすることは不可能であり、また、試験紙法では多成分を同時に測定できるが半定量しかできないという欠点がある。

【0007】化学発光法には、発光物質が必要であり、抗原抗体反応を介するイムノアッセイ法は、一般的に洗浄が必要であり、工数が多く、干渉物の影響や非特異吸着の恐れがある。

【0008】クロマトグラフィー法では高価な装置が必要であり、一般的に測定に時間がかかる。また、消耗品

であるカラムは高価であり、コスト高になる問題がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は消耗品である試薬、試験紙片及び酵素などを不要にし、さらにはそれらの消耗品の使用前の保存安全性や使用後の廃棄の問題、誤差を生じる原因となる煩雑な操作や他の成分による干渉作用などの問題をなくし、さらに多成分を同時に定量測定する方法を提供することを目的とするものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は被測定物質中の各体液中成分から固有のラマンスペクトルを得、そのスペクトルを利用してそのスペクトル強度もしくはスペクトル積算強度又は任意の波数範囲の複数の波数におけるラマンスペクトル強度から各成分を定性・定量測定するものである。本発明の第1の態様では、測定しようとする体液中の各成分について、その成分の濃度とラマンスペクトル強度との相関が良好な波数をその成分固有の測定波数として予め選択し、体液試料に対しラマン励起光を照射し、測定しようとする各成分についてのそれぞれの測定波数でのラマンスペクトル強度を測定し、各成分についてそれぞれの測定波数でラマンスペクトル強度とその成分の濃度について予め作成した検量線を利用して体液中の各成分を同時に定性・定量分析する。測定波数

でのラマンスペクトル強度はラマンスペクトルのピークのピーク高さを意味するものである。ピーク高さに代えてその測定波数を含む測定波数範囲のラマンスペクトルピークのピーク面積を測定して定性・定量してもよい。測定波数範囲でのラマンスペクトル積算強度はラマンスペクトルピークのピーク面積を意味するものである。

【0011】本発明の第2の態様では、体液試料に対しラマン励起光を照射し、測定しようとする体液中の複数の各成分の濃度とラマンスペクトル強度との相関が良好な波数を各成分固有の測定波数としてそれらの測定波数でのラマンスペクトル強度を測定し、又は任意の波数範囲の複数の波数におけるラマンスペクトル強度を測定し、多変量回帰分析により体液試料中の複数成分を同時に定性・定量分析する。

【0012】本発明で用いる「ラマン」なる語句は、狭い意味でのラマン散乱だけでなく、蛍光が発生している場合にはその蛍光も同時に検出されるので、ラマン散乱及び蛍光を含んだ意味で使用している。

【0013】測定しようとする各体液中成分について、その単成分水溶液の濃度とこの固有なラマンスペクトル強度との間の相関係数 R^2 が0.8以上、好ましくは0.9以上の波数をその成分固有の測定波数として選択する。相関係数 R^2 は次の式により与えられる。

【数2】

$$R^2 = \frac{(\sum_{i=1}^n [(x_i - X)(y_i - Y)])^2}{[\sum_{i=1}^n (x_i - X)^2][\sum_{i=1}^n (y_i - Y)^2]}$$

x_i : 体液中成分の各点の濃度

y_i : x_i に対するラマンスペクトル強度

X : 体液中成分の各点の濃度の平均値

Y : ラマンスペクトル強度の平均値

【0014】各成分の好ましい測定波数又は測定波数範囲は、アルブミンに対しては590～650 cm^{-1} 付近、800～860 cm^{-1} 付近、2342～2402 cm^{-1} （図6参照）から選択し、グロブリンに対しては158～218 cm^{-1} 付近、402～462 cm^{-1} 付近、623～683 cm^{-1} 付近、807～867 cm^{-1} 付近、822～862 cm^{-1} 付近、1353～1413 cm^{-1} 付近、1562～1622 cm^{-1} 付近、1847～1907 cm^{-1} 付近、2095～2155 cm^{-1} 付近、2340～2400 cm^{-1} 付近、2403～2463 cm^{-1} 付近（図3参照）から選択し、ヘモグロビンに対しては、807～867 cm^{-1} 付近、893～953 cm^{-1} 付近、1353～1413 cm^{-1} 付近、1562～1622 cm^{-1} 付近、1840～1900 cm^{-1} 付近、2095～2155 cm^{-1} 付近、2340～2400 cm^{-1} 付近、2403～2463 cm^{-1} 付近（図3参照）から選択し、グルコースに対しては、200～554 cm^{-1} 付近、810～944 cm^{-1} 付近、2590～2940 cm^{-1} 付近（図8参照）

から選択し、アセト酢酸リチウムに対しては、799～859 cm^{-1} 付近、1353～1413 cm^{-1} 付近、1840～1900 cm^{-1} 付近、2347～2407 cm^{-1} 付近、2907～2967 cm^{-1} （図3参照）付近から選択し、 β -ヒドロキシ酪酸に対しては、1420～1480 cm^{-1} 付近、1557～1617 cm^{-1} 付近、1600～1660 cm^{-1} 付近、2870～2971 cm^{-1} 付近（図3参照）から選択し、アセトンに対しては、775～845 cm^{-1} 付近、1050～1110 cm^{-1} 付近、1207～1267 cm^{-1} 付近、1399～1459 cm^{-1} 付近、1680～1740 cm^{-1} 付近、2911～2971 cm^{-1} 付近（図1参照）から選択し、ジタウロビリルビンに対しては、927～987 cm^{-1} 付近、1233～1293 cm^{-1} 付近、1586～1616 cm^{-1} 付近（図3参照）から選択し、ウロビリニンに対しては、332～2900 cm^{-1} から任意の位置を選択し、亜硝酸ナトリウムに対しては、783～843 cm^{-1} 付近、1318～1378 cm^{-1} 付近（図3参照）から選択し、尿素に対しては、501～561 cm^{-1} 付近、567～627 cm^{-1} 付近、978～1048 cm^{-1} 付近、1033～1093 cm^{-1} 付近、1138～1198 cm^{-1} 付近、1583～1643 cm^{-1} 付近（図10参照）から選択し、尿酸に対して

は、640~700 cm^{-1} 付近 (図 4 0 参照) から選択し、葉酸に対しては、631~691 cm^{-1} 付近、816~876 cm^{-1} 付近、901~961 cm^{-1} 付近、1355~1415 cm^{-1} 付近、1562~1622 cm^{-1} 付近、1847~1907 cm^{-1} 付近、2093~2153 cm^{-1} 付近、2339~2399 cm^{-1} 付近、2400~2460 cm^{-1} 付近 (図 4 1 参照) から選択し、アスコルビン酸に対しては、800~860 cm^{-1} 付近、1673~1733 cm^{-1} 付近、2919~2979 cm^{-1} 付近 (図 4 2 参照) から選択し、ビタミン B₂ に対しては、404~464 cm^{-1} 付近、626~686 cm^{-1} 付近、798~858 cm^{-1} 付近、860~920 cm^{-1} 付近、1317~1377 cm^{-1} 付近、1546~1606 cm^{-1} 付近、1834~1894 cm^{-1} 付近、2106~2166 cm^{-1} 付近、2360~2420 cm^{-1} 付近、2419~2479 cm^{-1} 付近 (図 4 3 参照) から選択し、クレアチン 1 水和物に対しては、800~860 cm^{-1} 付近、1563~1623 cm^{-1} 付近 (図 4 4 参照) から選択し、クレアチニンに対しては、538~598 cm^{-1} 付近、580~640 cm^{-1} 付近、665~725 cm^{-1} 付近、817~877 cm^{-1} 付近、868~928 cm^{-1} 付近、1021~1081 cm^{-1} 付近、1550~1610 cm^{-1} 付近、2868~2900 cm^{-1} 付近、2900~2950 cm^{-1} 付近、2950~2996 cm^{-1} 付近 (図 4 5 参照) から選択し、 α -アミラーゼに対しては、393~453 cm^{-1} 付近、631~691 cm^{-1} 付近、792~852 cm^{-1} 付近、868~928 cm^{-1} 付近、1333~1393 cm^{-1} 付近、1546~1606 cm^{-1} 付近、1834~1894 cm^{-1} 付近、2334~2394 cm^{-1} 付近 (図 4 6 参照) から選択し、 β -アミラーゼに対しては、376~436 cm^{-1} 付近、622~682 cm^{-1} 付近、783~843 cm^{-1} 付近、868~928 cm^{-1} 付近、1334~1394 cm^{-1} 付近、1546~1606 cm^{-1} 付近、1834~1894 cm^{-1} 付近、2665~2725 cm^{-1} 付近 (図 4 7 参照) から選択し、アンモニアに対しては、3190~3250 cm^{-1} 付近、3292~3350 cm^{-1} 付近、3377~3437 cm^{-1} 付近 (図 4 8 参照) から選択し、イノシトールに対しては、404~464 cm^{-1} 付近、805~865 cm^{-1} 付近、1014~1074 cm^{-1} 付近、1438~1498 cm^{-1} 付近、2966~3026 cm^{-1} 付近 (図 4 9 参照) から選択し、ガラクトースに対しては、466~526 cm^{-1} 付近、835~895 cm^{-1} 付近、1032~1092 cm^{-1} 付近、1237~1297 cm^{-1} 付近、1332~1392 cm^{-1} 付近、1438~1498 cm^{-1} 付近、2946~3006 cm^{-1} 付近 (図 5 0 参照) から選択し、フルクトースに対しては、569~629 cm^{-1} 付近、772~832 cm^{-1} 付近、1044~1106 cm^{-1} 付近、1237~1297 cm^{-1} 付近、1438~1498 cm^{-1} 付近、2966~2996 cm^{-1} 付近 (図 5 1 参照) から選択する。

【0015】体液検体が上記成分のうちの 2 成分以上を含んでいる場合は、体液検体に単一波長の励起光を照射してその体液検体からの散乱光を受光して得たラマンスペクトルのうち、各成分に対して上記のように設定された波数域で、かつ互いに重ならない波数域でのスペクトル強度をもとに各成分濃度を算出することが望ましい。

【0016】多変量回帰分析演算は主成分回帰分析法 (PCR 法) や部分最小二乗法 (PLS 法) などの多変

量回帰分析法を用いてデータ解析を行う。多変量回帰分析法では、一度に多くのスペクトル強度を用いて回帰分析することができるので、単回帰分析に比べて高い精度の定量分析が可能である。重回帰分析はもっとも多用されているが、多数の試料が必要であり、各波数でのスペクトル強度同士の相関が高い場合にはその定量分析精度は低くなる。一方、多変量回帰分析法である PCR 法は複数の波数域でのスペクトル強度を互いに無関係な主成分に集約させることができ、さらに不必要なノイズデータを削除することができるので、高い定量分析精度が得られる。また PLS 法は主成分の抽出の際に試料濃度のデータも利用することができるので、PCR 法と同様に高い定量分析精度を得ることができる。多変量回帰分析に関しては『多変量解析』(中谷和夫著、新曜社)を参考にできる。

【0017】種々の変動要因により複雑に変動するスペクトルから必要な情報を引き出すには、コンピュータによるデータ処理が大いに役立つ。代表的な処理法は市販の近赤外装置等に装備されている処理用ソフトウェアにも収容されている。また市販のソフトウェアとして C O M O 社のアンス克蘭バーなどがある。代表的な処理法とは上に挙げた重回帰分析や PLS 法、主成分回帰分析等である。

【0018】定量分析に適用するデータ処理の大きな流れは、①キャリブレーションモデルの作成、②キャリブレーションモデルの評価、③未知試料の定量である。キャリブレーションを行うには、適当な数の検量線作成用試料を十分な精度で測定する必要がある。得られたスペクトルは必要に応じて前処理を行う。代表的な前処理としては、スペクトルの平滑化や微分、正規化があり、いずれも一般的な処理である。

【0019】次に、キャリブレーションは、スペクトルデータと目的特性の分析値との間の数学的関係式、すなわちモデルを構築する処理である。モデルの作成は、検量線作成用試料の分析値とスペクトルデータを用い、統計的手法によって行われる。

【0020】作成された検量線の未知試料に対する予測の精度正しく評価するため、評価用試料により、未知試料に対する測定誤差が求められる。検量線の精度が不十分であると判定されたときは、必要に応じて処理法の種類やパラメーターの変更などを行い、検量線の修正を行う。精度が充分であると認められた検量線は未知試料の分析に際し、スペクトルデータから目的特性の値を予測する関係式として使用され、未知試料濃度の定量に用いられる。

【0021】図 5 4 に多変量回帰分析の一般的な手順をフローチャートとして示す。検量線作成用試料 (分析値既知) のラマンスペクトル測定を行ない、必要に応じて平滑化や正規化等の前処理を行なった後、得られたラマンスペクトルデータ (各波数におけるラマンスペクトル

強度)から、多変量回帰分析を用いてキャリブレーションを行なってキャリブレーションモデルを作成する。

【0022】次に、このキャリブレーションモデルを評価するための評価用試料(分析値既知)のラマンスペクトル測定を行ない、必要に応じて平滑化や正規化等の前処理を行なった後、得られたラマンスペクトルデータをキャリブレーションモデルに代入し、評価用試料の実測値とキャリブレーションモデルからの計算値とを比較し、キャリブレーションモデルの精度を評価する。精度が不十分である場合は検量線作成用試料のスペクトル測定や前処理、キャリブレーションモデルの作成等の段階に戻り、必要に応じて処理の変更を行ない、キャリブレーションモデルに修正を加え、評価用試料のラマンスペクトルデータによって評価を繰り返す。十分な精度が得られたと判定されると、未知試料(分析値未知)のラマンスペクトル測定により得られたラマンスペクトルデータをこのキャリブレーションモデルに代入し、濃度を計算する。

【0023】本発明は尿や血液などの体液を検体とした臨床検査の手法として使用する。アルブミンとグロブリンはネフローゼ症候群や腎炎など、ヘモグロビンは尿路系等の炎症や腫瘍、グルコースは糖尿病、アセト酢酸リチウムと β -ヒドロキシ酪酸及びアセトンはケトアシドーシス、ビリルビンは肝・胆道疾患、ウロビリノーゲンは肝・胆道疾患や溶血性疾患、亜硝酸ナトリウムは尿路系の細菌感染などの指標となる。尿中尿素は体内タンパク代謝、肝・腎機能などを知るうえで有用であり、これが増加すると体タンパク異化の亢進やキニーネ等の薬物服用が考えられ、減少すると肝実質障害や腎機能不全が危ぶまれる。さらに尿中尿素量は尿比重の指標となることも分かっており(『新訂臨床検査研修ハンドブック3』小酒井望、薬事日報社)、一般的に浸透圧・屈折率・尿比重は相関が良く、三者の判定は比重で代用される

(『臨床検査法提要』金井正光、金原出版株式会社)。さらに、尿酸は尿路結石や高尿酸血症、葉酸は胃や腸切開に伴う吸収不良症候群や悪性腫瘍、クレアチンはステロイドミオパチー発症、クレアチニンは筋疾患や腎疾患、急性膀胱炎や尿管閉塞、アンモニアは代謝異常や重症肝疾患などの指標となる。

【0024】また、ビリルビンは水に不溶であるため、実験に際してジタウロビリルビンを使用した。ジタウロビリルビンとはタウリン抱合型ビリルビンのことで、基本骨格は共通で、2つのカルボニル基がタウリンと脱水結合したものである。You-Zing Hsiehら(Langmuir 1987, 3, 1141-1146)が行ったビリルビンのSERS(表面増強ラマン分光法)スペクトルと比べると、今回得られたラマンスペクトルの690.065 cm^{-1} 付近のピーク以外は、ほぼ同じスペクトルであるため、これ以外はビリルビン由来のピークであると言える。また、 CH_2 横ゆれ振動と思われる957.5 cm^{-1} 付近のピークは $-\text{CH}_2-$ の縦ゆれ

振動と考えられるが、タウリン部分の CH_2 もスペクトルに含まれているので、ビリルビンでは相対強度が若干低くなると予想できる。

【0025】また、ウロビリンに関しては、ウロビリノーゲンは不安定であり、空気酸化で容易にウロビリンになるため、ウロビリンで測定を行った。ウロビリンはウロビリノーゲンの $-\text{NH}-$ の1つが酸化され、 $-\text{N}=$ になったものである。この $-\text{NH}-$ のピーク位置は3530~3480 cm^{-1} であり、溶媒である水のO-H伸縮振動(3650~3400 cm^{-1})の位置と重なり、隠れてしまうため、両者のスペクトルはほぼ同一と予想できる。アルブミンの2372.8 cm^{-1} 付近のピークは $\text{NH}+$ 伸縮振動によるものと考えられる。

【0026】グロブリンの188.232 cm^{-1} 付近のピーク及び432.919 cm^{-1} 付近のピークはCCCからの振動、653.937 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 , CHからの振動、837 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動、852 cm^{-1} 付近のピークは CH_2CH からの振動、1383.49 cm^{-1} 付近のピークはアミドIIIの振動、1592.41 cm^{-1} 付近のピークはアミドIIの振動、1877.64 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動、2125.39 cm^{-1} 付近のピークはCCからの振動、2370 cm^{-1} 付近のピークは $\text{NH}+$ からの振動、2433 cm^{-1} 付近のピークはSHからの振動によるものと考えられる。

【0027】ヘモグロビンの837 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動、923.373 cm^{-1} 付近のピークはCH3からの振動、1383.49 cm^{-1} 付近のピークはアミド'IIIの振動、1592.41 cm^{-1} 付近のピークはアミドIIの振動、1870.82 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動、2125.39 cm^{-1} 付近のピークはCCからの振動、2370 cm^{-1} 付近のピークは $\text{NH}+$ からの振動、2433 cm^{-1} 付近のピークはSHからの振動によるものと考えられる。また、共鳴ラマン分光法によるオキシヘモグロビンのスペクトルが『ラマン分光学』(P. R. CAREY著)に記載されているので、それを参考にした。

【0028】D-グルコースの405 cm^{-1} 付近のピークはC-COからの振動、524 cm^{-1} 付近のピークは基本骨格振動、648 cm^{-1} 付近のピークはCCからの振動、779 cm^{-1} 付近のピーク及び840 cm^{-1} 付近のピークはCHからの振動、914 cm^{-1} 付近のピークはCHとCOHからの振動、1054 cm^{-1} 付近のピークはCHからの振動、1076 cm^{-1} 付近のピークはCHとCOHからの振動、1276 cm^{-1} 付近のピーク及び1346 cm^{-1} 付近のピークはCOHからの振動、1426 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動、1640 cm^{-1} 付近のピークはHOHからの振動、2900 cm^{-1} 付近のピークはCHと CH_2 からの振動によるものと考えられる。

【0029】アセト酢酸リチウムの829.379 cm^{-1} 付近のピーク、1383.49 cm^{-1} 付近のピーク及び1870.82 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動、2937 cm^{-1} 付近のピークはCH3と CH_2 からの振動によるものと考えられる。

【0030】 β -ヒドロキシ酪酸の1450.98 cm^{-1} 付近の

ピークは CH_2 からの振動と CO_2 -からの振動、 1587.69 cm^{-1} 付近のピークは CO_2 -からの振動、 1630 cm^{-1} 付近のピークは CO からの振動、 2900 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動、 2959 cm^{-1} 付近のピークは CH_3 からの振動によるものと考えられる。

【0031】アセトンの 805 cm^{-1} 付近のピーク、 1080 cm^{-1} 付近のピーク、 1429 cm^{-1} 付近のピーク及び 2940 cm^{-1} 付近のピークは CH_3 からの振動、 1237 cm^{-1} 付近のピークは CH_3C からの振動、 1710 cm^{-1} 付近のピークは CO からの振動によるものと考えられる。

【0032】ジタウロピリルビンの 690.065 cm^{-1} 付近のピークは CC からの振動、 957.5 cm^{-1} 付近のピーク及び 1458.88 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動、 1263.96 cm^{-1} 付近のピークは CH_2 からの振動と CO からの振動、 1616.29 cm^{-1} 付近のピークは CC からの振動と CO からの振動によるものと考えられる。

【0033】ウロピリンはそれ自体が持つ蛍光が強く、ラマンピークは得られなかった。亜硝酸ナトリウムの 813 cm^{-1} 付近のピーク及び 1339.5 cm^{-1} 付近のピークは N からの振動によるものと考えられる。

【0034】尿素の 531.939 cm^{-1} 付近のピーク、 1008 cm^{-1} 付近のピーク及び 1168.35 cm^{-1} 付近のピークは C からの振動、 597.248 cm^{-1} 付近のピークは CO からの振動、 1613.67 cm^{-1} 付近のピークは CO と NH_2 からの振動と考えられる。

【0035】試料として尿を測定する場合は、時間当りの排泄量が一定しているクレアチニンの濃度を基準にして他の尿成分の濃度を規格化することにより、尿量で変化する尿成分濃度を補正することができる。

【0036】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例】ここで、本発明の測定法を実施するための測定装置の例を図1と図2に示す。図1は装置構成のブロック図であり、光源部1、試料部2、測定対象光学調整部3、補正光学調整部4、分光検出部5及びデータ処理部6からなる。図2に図1のブロック図を詳細に表した具体的な例を示す。光源部1は、単一波長光を発生する励起光源7と、励起光源7からの励起波長のみを透過させ、その他の光は反射するバンドパスフィルター27と、励起光源7からの光束を試料用光束24sと補正用光束24rとに分割するハーフミラー9と、ハーフミラー9を挟んで試料部2の試料11に試料用光束24sを収束させるための光源集光レンズ8及び集光レンズ10を備えている。

【0037】光源7としては、例えばレーザ装置が用いられる。レーザ装置としては連続発振をするArイオンレーザ、Krイオンレーザ、He-Neレーザ、He-Cdレーザ、Nd:YAGレーザなど、又はパルスレーザなどを用いることができ、近紫外域から近赤外域に渡

る広い波長範囲のレーザから選択して利用することが出来る。レーザ装置以外の光源としてハロゲンランプなどの多波長光を発生する光源を分光器と組み合わせて用いることもできる。

【0038】試料部2には体液試料11がセル26に入れられて設置され、その体液試料11に試料用光束24sが照射される。

【0039】測定対象光学調整部3は、試料セル26中に収められた試料11に試料用光束24sが照射されて発生した散乱光から励起光と同じ波長成分を除去して蛍光とラマン散乱光を含んだ測定対象光を取り出すフィルタ手段14と、散乱光を分光器の入口スリット25に収束させるようにビームを調整する光学系13、15とを備えている。測定対象光学調整部3の出口位置には、測定対象光学調整部3からの試料用光束24sと補正光学調整部4から出射した補正用光束24rとを同一の光路上に置く合波手段としてのハーフミラー16が設けられている。

【0040】測定対象光学調整部3におけるフィルタ手段14は、励起光波長をノッチ領域に含むホログラフィック・ノッチ・フィルタ、又は励起光波長を含みそれより短波長側を遮蔽するカットフィルタであることが望ましい。ホログラフィック・ノッチ・フィルタは、所望の波長領域のみを遮蔽し、その他の領域の波長光を透過させるものである。その遮蔽される領域（ノッチ領域）に励起光波長が含まれたものを使用することで、測定対象光学調整部3から出射する試料用光束24sは測定対象光成分のみを含んだものとなる。

【0041】ホログラフィック・ノッチ・フィルタは例えばKAISER OPTICAL SYSTEMS, INC. (アメリカ) から入手することが出来る。ホログラフィック・ノッチ・フィルタ14は、例えばノッチ領域に含まれる波長光を完全に遮蔽し、ノッチ領域以外の波長領域の光は80%以上を透過させる特性を持っている。

【0042】補正光学調整部4は、励起光源部1でハーフミラー9により分割された補正用光束24rの光量を減衰させる減衰フィルタ17と、光路を折り曲げるミラー18を備えている。補正用光束24rは光源からの励起光強度の変動によるスペクトル光強度の変動を補正するものであり、そのような補正を必要としない場合は、光源部1でのハーフミラー9、補正光学調整部4及び合波手段であるハーフミラー16は不要になる。補正用光束24rは光源7からの励起光のみを含み、試料を経ないため、試料には依存せず、光源からの強度変動を忠実に表したものとなる。

【0043】分光検出部5は、測定対象光学調整部3からの試料用光束24sと補正光学調整部4から出射した補正用光束24rとをハーフミラー16から入口スリット25を経て取込み分光する分光器21と、その分光器21により分光されたスペクトル光を検出する検出器2

0とを備えている。

【0044】分光検出部5は検出器20としてマルチチャンネル光検出器を備え、測定しようとする波長領域を同時に検出するポリクロメータであることが望ましい。分光検出部5がポリクロメータであるときは、測定しようとする波長領域を同時に検出することができ、所定領域の測定対象光スペクトルと励起光とを同時に検出することが出来る。その結果、測定対象光の各波長の検出時間と励起光との検出時間に差が生じない。しかし、測定対象光の各波長の検出時間と励起光との検出時間に差が生じてよい場合は、分光検出部5は分光器21として波長走査型の分光器を備え、検出器20としてシングルチャンネル光検出器を備え、測定しようとする波長領域を順次検出するものであってもよい。

【0045】データ処理部6は、処理演算コントロール部22と出力装置23を備え、分光検出部5の検出器20により検出された分光スペクトル中の励起光成分の検出強度を基準にして測定対象光強度を補正する機能を有する。

【0046】処理演算コントロール部22は各部の動作を制御したり、分光検出部5が検出した信号をスペクトル解析や多変量解析などの処理を行い、分光検出部5により検出された分光スペクトル中の励起光成分の検出強度を基準にして測定対象光の検出強度を補正するデータ処理も行い、光源の変動が補正されたラマン散乱スペクトルを演算したり、測定対象光強度から試料の定性や定量も行う。出力装置23は処理演算コントロール部22で処理されたデータを入力するプリンタやディスプレイなどである。

【0047】この実施例の動作を説明すると、光源部1からの試料用光束24sは、測定対象光学調整部3に配置されたハーフミラー12で反射されて試料部2の試料11に照射される。試料11からの散乱光は測定対象光学調整部3を経て励起光と同じ波長成分が除去され、ハーフミラー16を経て入口スリット25から分光器21に入射する。一方、励起光源部1でハーフミラー9により分割された補正用光束24rは、補正光学調整部4を経て光量が調整され、ハーフミラー16を経て入口スリット25から分光器21に入射する。補正用光束24rにより励起光強度の変動によるスペクトル光強度の変動が補正されて、各成分のラマンスペクトル強度が検出される。

【0048】なお、入射光に対して、被測定物質11からの散乱光のなす角を θ とすると、図2の実施例では、 $\theta = 180^\circ$ としているが、これに限るものでなく、 $0^\circ \leq \theta < 360^\circ$ であればよい。

【0049】図3は、 $\theta = 90^\circ$ の場合の装置を示し、図2に示す装置と互いに共通する部分については同一番号を付して説明を省略する。

【0050】図4はフローセル使用時の被測定物質11

の流入及び排出の経路例を示した図である。被測定物質11は検体液流入ライン32からセルホルダー30内のフローセルに流入し、セルホルダー30の側面に開けられた励起光入射窓34から入射した励起光がそのフローセルに照射され、フローセル中で励起されたラマン光はラマン光出射窓36から出て測定対象光学調整部3に入る。測定後、被測定物質11は検体液排出ライン38を通り、廃液ボトル40に廃棄される。また、この検体液排出ライン38は、下水などの水路に直接通じていてもよい。

【0051】図4のフローセルでは、 $\theta = 90^\circ$ としているが、これに限るものでなく、 $0^\circ \leq \theta < 360^\circ$ であればどの位置にラマン光出射窓36があっても良い。

【0052】（実施例1）

正常尿のラマン測定

図5は正常尿のラマンスペクトルである。1000 cm^{-1} 付近のピークは尿素由来のもので、1650 cm^{-1} 付近と3000～3700 cm^{-1} 付近のピークは溶媒である水に由来する。

【0053】（実施例2）

ラマン分光法を用いた尿中アルブミンの定量

図6と7は、正常尿に対してアルブミンの増量試験を行った結果である。図6は正常尿にアルブミンを約15mg/ml増量した試料のスペクトルを表したものである。尿中に存在する複数の成分が異なる濃度で存在するので、複合的なスペクトルになっている。このスペクトルの2370 cm^{-1} の強度と濃度との相関関係を調べた結果が、図7である。

【0054】（実施例3）

ラマン分光法を用いた尿中グルコースの定量

図8と9は、正常尿に対してグルコースの増量試験を行った結果である。図8は正常尿にグルコースを飽和量増量した試料のスペクトルを表したものである。このスペクトルの波数0～4000 cm^{-1} でのラマンスペクトル強度と濃度との相関関係を調べた結果が、図9である。

【0055】（実施例4）

ラマン分光法を用いた尿中尿素の定量

図10と11は、正常尿に対して尿素の増量試験を行った結果である。図10は正常尿に尿素を300mg/ml増量した試料のスペクトルを表したものである。このスペクトルの1008 cm^{-1} の強度と濃度との相関関係を調べた結果が、図11である。

【0056】（実施例5）

ラマン分光法を用いた尿中アセトンの定量

図12と13は、正常尿に対してアセトンの増量試験を行った結果である。図12は正常尿にアセトンを60%（V/V）増量した試料のスペクトルを表したものである。このスペクトルの1080 cm^{-1} の強度と濃度との相関関係を調べた結果が、図13である。

【0057】（実施例6）

ラマン分光法を用いた尿中アセトン、尿素及びグルコー

スの同時定量

図 1 4～1 6 は正常尿に対してアセトン、尿素及びグルコースをそれぞれ異なる濃度で添加し、測定した結果である。図 1 4 は正常尿にアセトンを 37.5% (V/V) になるように添加した試料のスペクトルである。図 1 5 は正常尿にアセトンを 17% (V/V)、尿素を 25mg/ml、グルコースを 416 μ g/ml になるように添加した試料のスペクトルであり、図 1 6 はアセトンを 17% (V/V)、尿素を 50mg/ml、グルコースを 1.17mg/ml になるように添加した試料のスペクトルである。

【0058】図 1 7～2 2 は尿素に関して、1008 cm^{-1} 、1063 cm^{-1} 、1168 cm^{-1} 、531 cm^{-1} 、597 cm^{-1} 及び 1613 cm^{-1} の波数位置で、ラマンスペクトル強度と濃度との相関をとったものである。また、図 2 3～2 6 はアセトンに関して、805 cm^{-1} 、1237 cm^{-1} 、1429 cm^{-1} 及び 2941 cm^{-1} の波数位置で、同様に相関をとったものであり、図 2 7 はグルコースに関して 2924 cm^{-1} の波数位置で同様に相関をとったものであり、いずれも相関係数 R^2 は 0.9 以上で、良好な結果が得られた。

【0059】(実施例 7)

ラマン分光法を用いた尿中タンパク及びアセト酢酸リチウムの同時定量

図 2 8～3 0 は正常尿に対してアルブミン及びアセト酢酸リチウムをそれぞれ異なる濃度で添加し、測定した結果である。図 2 8 はアルブミンを 0.66mg/ml、アセト酢酸リチウムを 1.4mg/ml になるように添加した試料のスペクトルである。

【0060】図 2 9 はアルブミンに関して 620 cm^{-1} の強度と濃度との相関関係を調べた結果である。また、図 3 0 はアセト酢酸リチウムに関して 829 cm^{-1} の強度と濃度との相関関係を調べた結果である。いずれも相関係数 R^2 は 0.9 以上であり、良好な結果が得られた。

【0061】(実施例 8)

ラマン分光法を用いた尿中ウロビリルン及びジタウロビリルビルの同時定量

図 3 1～3 3 は正常尿に対してウロビリルン及びジタウロビリルビンをそれぞれ異なる濃度で添加し、測定した結果である。図 3 1 はウロビリルンを 0.13mg/ml、ジタウロビリルビンを 0.286mg/ml になるように添加した試料のスペクトルである。

【0062】図 3 2 はウロビリルンに関して 2370 cm^{-1} の強度と濃度との相関関係を調べた結果である。また、図 3 3 はジタウロビリルビンに関して 1263 cm^{-1} の強度と濃度との相関関係を調べた結果である。いずれも相関係数 R^2 は 0.9 以上であり、良好な結果が得られた。

【0063】(実施例 9)

ラマン分光法を用いた尿中成分の検出

図 3 4～3 9 は正常尿に対してアセト酢酸リチウム (13.3mg/ml)、 β -ヒドロキシ酪酸 (16%, V/V)、グロブリン (30mg/ml)、ヘモグロビン

(30mg/ml)、ジタウロビリルビン (0.3mg/ml)、亜硝酸ナトリウム (55.28mg/ml) をそれぞれ添加し、測定した結果である。

【0064】任意のピークの強度変化を確認することで、その存在の有無が確認できる。例えば、図 3 4 のアセト酢酸リチウムでは 829 cm^{-1} に正常尿のスペクトルでは得られなかったラマンピークが出現している。これにより、アセト酢酸リチウムの存在が確認できる。同様に、図 3 5 の β -ヒドロキシ酪酸では 1630 cm^{-1} のピークが、図 3 6 のグロブリンでは特に 852 cm^{-1} のピークが、図 3 7 のヘモグロビンでは 1592 cm^{-1} のピークが、図 3 8 のジタウロビリルビンでは 1616 cm^{-1} のピークが、図 3 9 の亜硝酸ナトリウムでは 813 cm^{-1} のピークがそれぞれ出現することを確認すれば、その存在の有無が確認できる。

【0065】(実施例 10)

ラマン分光法を用いた体液中成分の検出

図 4 0～5 1 は蒸留水に対して尿酸、葉酸、L-アスコルビン酸、ビタミン B₂、クレアチン 1 水和物、クレアチニン、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼをそれぞれ飽和量、アンモニアを 25% (V/V)、イノシトール、ガラクトース、フルクトースをそれぞれ飽和量になるように添加し、測定した結果である。

【0066】実施例 9 と同様に、任意のピークの強度変化を確認することで、その存在の有無が確認できる。図 4 0 の尿酸に対しては 670 cm^{-1} のピークが、図 4 1 の葉酸に対しては 661 cm^{-1} のピークが、図 4 2 のアスコルビン酸に対しては 1703 cm^{-1} のピークが、図 4 3 のビタミン B₂ に対しては 890 cm^{-1} のピークが、図 4 4 のクレアチン 1 水和物に対しては 830 cm^{-1} のピークが、図 4 5 のクレアチニンに対しては 695 cm^{-1} のピークが、図 4 6 の α -アミラーゼに対しては 1864 cm^{-1} のピークが、図 4 7 の β -アミラーゼに対しては 898 cm^{-1} のピークが、図 4 8 のアンモニアに対しては 3407 cm^{-1} のピークが、図 4 9 のイノシトールに対しては 443 cm^{-1} のピークが、図 5 0 のガラクトースに対しては 495 cm^{-1} のピークが、図 5 1 のフルクトースに対しては 599 cm^{-1} のピークがそれぞれ出現することを確認することで、その存在の有無を確認できる。

【0067】図 5 2 は各成分の測定波数を示した図表である。破線で囲んだ波数位置を選択することでピークの重複、混合回避でき、またトータルタンパク量を測定する際は 2370 cm^{-1} 付近を、トータルケトン体を測定する際は 2940 cm^{-1} 付近を選択して測定すればよい。また、本発明の精度を確認できるように、何種類かの被測定物質について得られた相関係数を一覧表に示した。図 5 3 がそれである。多変量回帰分析などの解析手法を用いることでさらに精度良く測定できる。

【0068】(実施例 11)

多変量回帰分析を用いた尿中複数成分の同時測定

正常尿に尿素を150mg/dl、300mg/dl、450mg/dl、亜硝酸ナトリウムを600mg/dl、1.2g/dl、1.8mg/dl、アセトン300mg/dl、600mg/dl、900mg/dlそれぞれ任意の組み合わせで添加し、スペクトル測定を行い、多変量回帰分析を用いて濃度の定量を行った。

【0069】尿中に存在する任意の物質の濃度Cは次の式で近似することができる。

【数3】

$$C = \sum_{i=1}^n k(\lambda_i) \cdot A(\lambda_i)$$

$k(\lambda_i)$: 波数 λ_i における比例定数

$A(\lambda_i)$: 波数 λ_i におけるラマン光強度

$k(\lambda_i)$ は分析値既知試料の濃度と、推定した濃度との相関係数が最も高くなるように、多変量回帰分析の手順の中で決定される。なお、この計算は市販の処理用ソフトウェアに予め組み込まれていて自動的に行なわれ、濃度を求めたい尿中物質ごとにこの式が作成される。

【0070】スペクトル測定から濃度定量までの処理を図54のフローチャートに従って行なった。本例では、一切の前処理は行わず、処理用ソフトウェアとして、パーキンエルマー社のQUANT+を用いた。処理法としてPCR法を採用した。また、フルクロスバリデーションを行う際は、キャリブレーションモデルの精度の評価は省くことができる。

【0071】図55は本例で得られた計算値と実測値(参照値)との相関図であり、相関係数 R^2 とSEPはそれぞれ尿素が0.986と18.13、亜硝酸ナトリウムが0.992と57.17、アセトンが0.956と69.74であった。ここで、SEPは、予測標準偏差であり、以下に示した計算式により算出される。

【数4】

$$SEP = \left\{ \sum_{i=1}^n (d_i - D)^2 / (n - 1) \right\}^{1/2}$$

d_i : キャリブレーションモデルによる計算値と実測値との差

D : d_i の平均値

n : 評価用試料の数

SEPが小さい方がキャリブレーションモデルの精度が高いことを意味する。

【0072】

【発明の効果】以上詳述した様な手法で同時に複数の成分が定性・定量できる。本発明では体液試料に対し、ラマン励起光を照射し得られたスペクトルから測定しようとする複数の体液中成分について、適当な波数位置の強度を得て、体液中の成分を定量分析できるようになり、試験紙や試薬などの消耗品が不要となり、また、使用後の廃棄の問題も発生しない。また、体液中の他の成分の干渉がある場合でも、多変量回帰分析法などの手法を利用することにより、体液中の複数成分を同時に定性・定

量分析できるようになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法を適用する測定装置の概略を示すブロック図である。

【図2】図1のブロック図を詳細に表した具体的な例を示す装置構成図であり、入射光に対して被測定物質からの散乱光を180°方向に取り出す例である。

【図3】図1のブロック図を詳細に表した具体的な例を示す装置構成図であり、入射光に対して被測定物質からの散乱光を90°方向に取り出す例である。

【図4】フローセル使用用の被測定物質の流入及び排出の経路を示した斜視図である。

【図5】正常尿のラマンスペクトルを示す図である。

【図6】正常尿にアルブミンを約15mg/ml増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図7】尿中のアルブミン濃度と波数2370.75cm⁻¹でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図8】正常尿にグルコースを飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図9】尿中のグルコース濃度と波数0~4000cm⁻¹のラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図10】正常尿に尿素を約300mg/ml増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図11】尿中の尿素濃度と波数1008cm⁻¹のラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図12】正常尿にアセトンを60%(V/V)になるように増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図13】尿中のアセトン濃度と波数1080cm⁻¹のラマン散乱光強度との相関を調べた図である。

【図14】正常尿にアセトンを37.5%(V/V)になるように増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図15】正常尿にアセトンを17%(V/V)、尿素を25mg/ml及びグルコースを416μg/mlになるように増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図16】正常尿にアセトンを17%(V/V)、尿素を50mg/ml及びグルコースを1.17mg/mlになるように増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図17】尿中の尿素濃度と波数1008cm⁻¹でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図18】尿中の尿素濃度と波数1063cm⁻¹でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図19】尿中の尿素濃度と波数1168cm⁻¹でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図20】尿中の尿素濃度と波数531cm⁻¹でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図21】尿中の尿素濃度と波数597cm⁻¹でのラマン

散乱光強度との相関を示す図である。

【図 2 2】尿中の尿素濃度と波数 1613 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 2 3】尿中のアセトン濃度と波数 805 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 2 4】尿中のアセトン濃度と波数 1237 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 2 5】尿中のアセトン濃度と波数 1429 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 2 6】尿中のアセトン濃度と波数 2941 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 2 7】尿中のグルコース濃度と波数 2924 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 2 8】正常尿にアルブミンを約 0.66 mg/ml とアセト酢酸リチウムを約 1.4 mg/ml 増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 2 9】尿中のアルブミン濃度と波数 620 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 3 0】尿中のアセト酢酸リチウム濃度と波数 829 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 3 1】正常尿にウロビリンを約 0.13 mg/ml とジタウロビリルビンを約 0.286 mg/ml 増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 3 2】尿中のウロビリン濃度と波数 2370 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 3 3】尿中のジタウロビリルビン濃度と波数 1263 cm^{-1} でのラマン散乱光強度との相関を示す図である。

【図 3 4】正常尿にアセト酢酸リチウムを 13.3 mg/ml 増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 3 5】正常尿に β -ヒドロキシ酪酸を 16% (V/V) になるように増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 3 6】正常尿にグロブリンを 30 mg/ml 増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 3 7】正常尿にヘモグロビンを 30 mg/ml 増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 3 8】正常尿にジタウロビリルビンを 0.3 mg/ml 増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 3 9】正常尿に亜硝酸ナトリウムを 55.28 mg/ml 増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 0】蒸留水に尿酸を飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 1】蒸留水に葉酸を飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 2】蒸留水にL-アスコルビン酸を飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 3】蒸留水にビタミン B_2 を飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 4】蒸留水にクレアチン1水和物を飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 5】蒸留水にクレアチニンを飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 6】蒸留水に α -アミラーゼを飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 7】蒸留水に β -アミラーゼを飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 8】蒸留水にアンモニアを 25% (V/V) になるように増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 4 9】蒸留水にイノシトールを飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 5 0】蒸留水にガラクトースを飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 5 1】蒸留水にフルクトースを飽和量増量した試料のラマンスペクトルを示す図である。

【図 5 2】各体液中成分の測定波数を示した図表である。

【図 5 3】抜粋した体液中成分について、それぞれの濃度とラマン散乱光強度との相関係数を示した図表である。

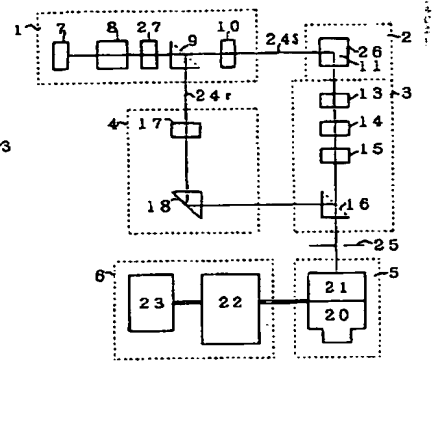
【図 5 4】多変量回帰分析法を適用する場合の、スペクトル測定から濃度定量までの手順を示すフローチャート図である。

【図 5 5】尿中の複数成分の多変量回帰分析法により算出した計算値と実測値との相関図である。

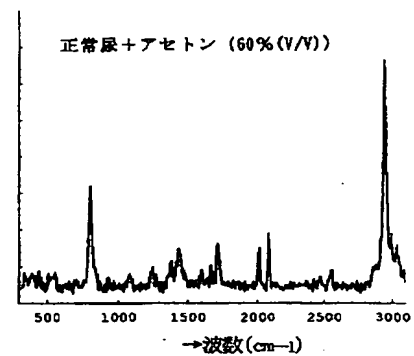
【符号の説明】

- 1 光源部
- 2 試料部
- 3 測定対象光学調整部
- 4 補正光学調整部
- 5 分光検出部
- 6 データ処理部

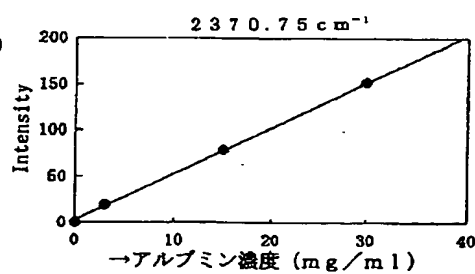
【図 3】



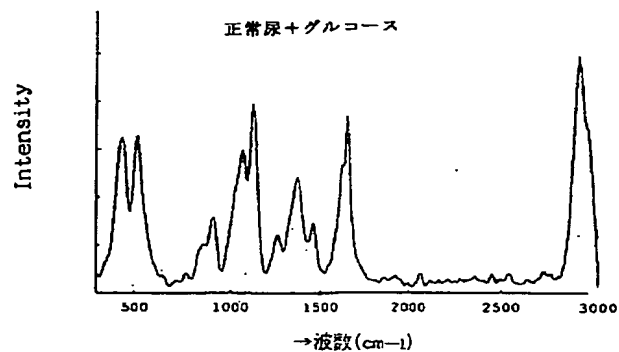
【图 1 2】



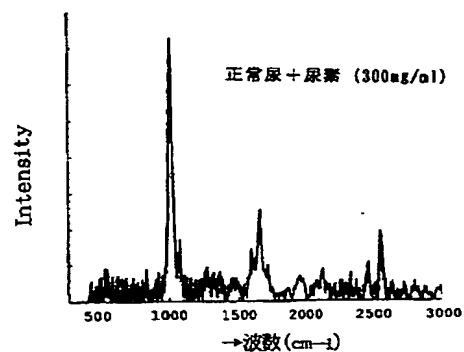
【図 7】



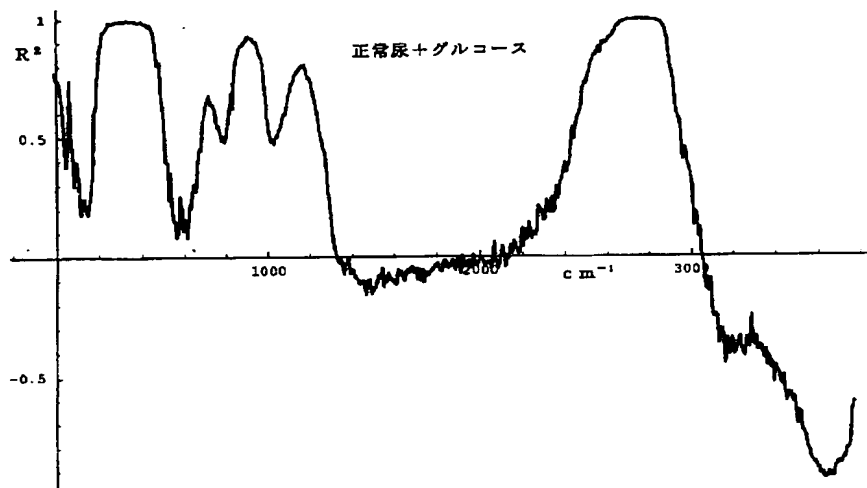
【図 8】



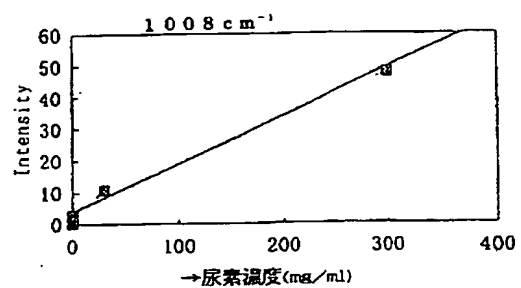
【図 10】



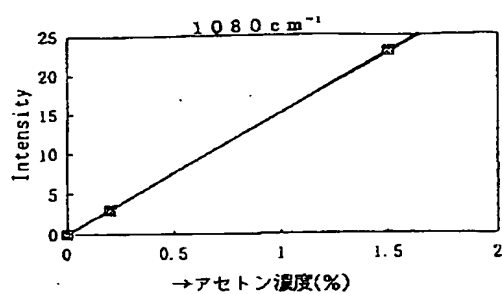
【図 9】



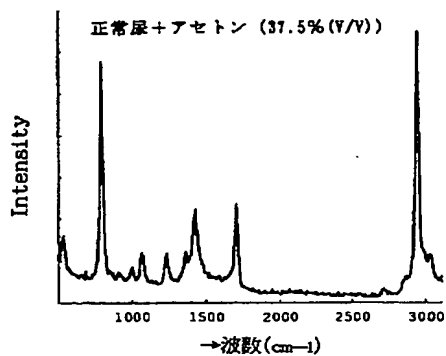
【図 11】



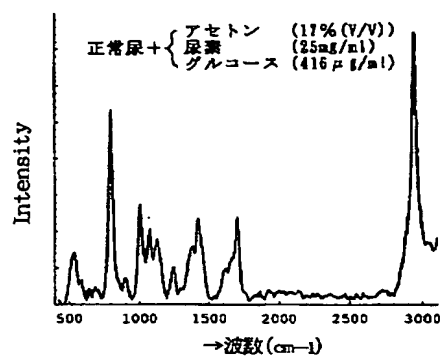
【図 13】



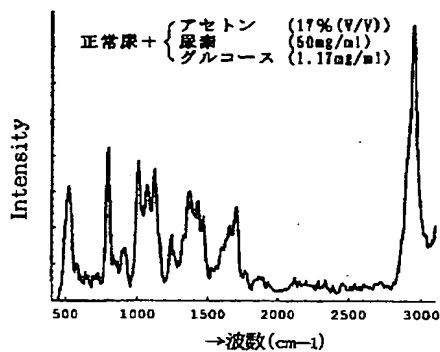
【図 14】



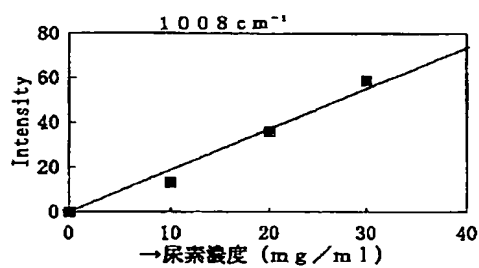
【図 15】



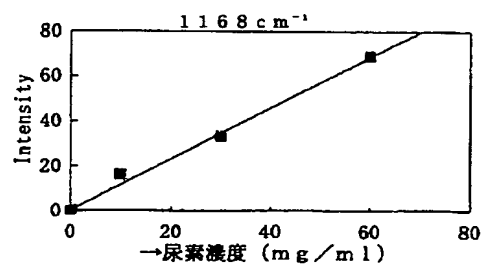
【図 16】



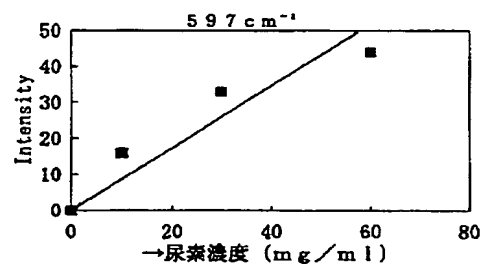
【図 17】



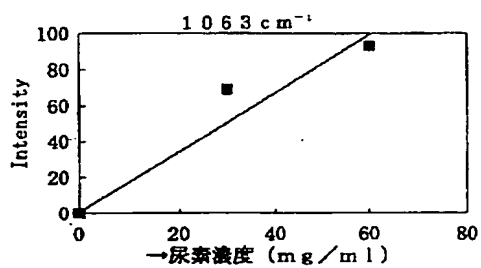
【図 19】



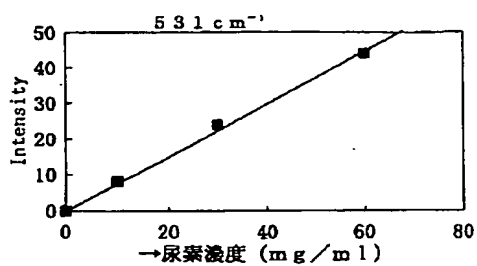
【図 21】



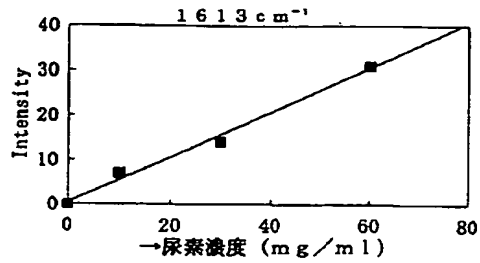
【図 18】



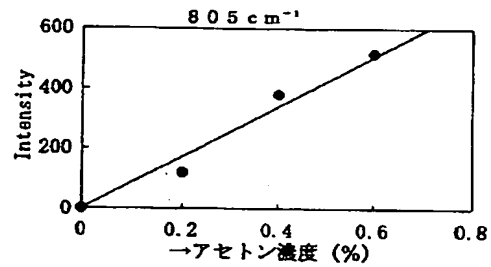
【図 20】



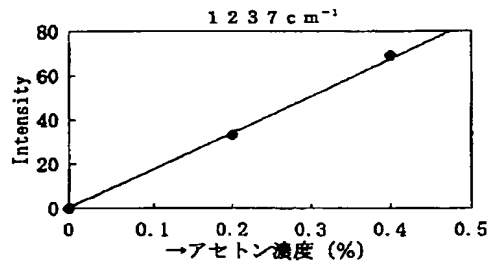
【図 2 2】



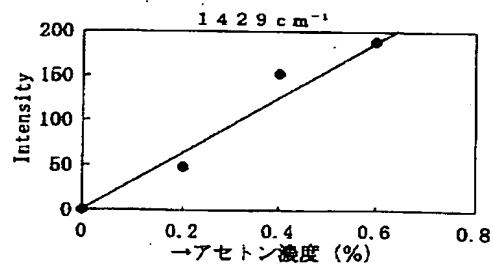
【図 2 3】



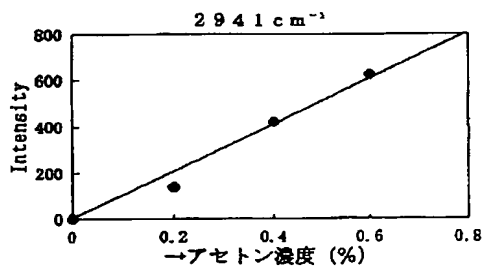
【図 2 4】



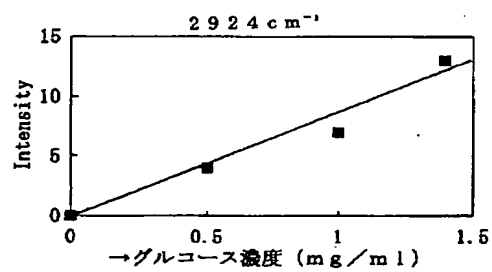
【図 2 5】



【図 2 6】



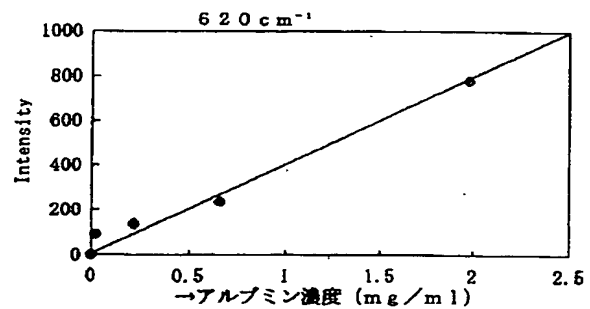
【図 2 7】



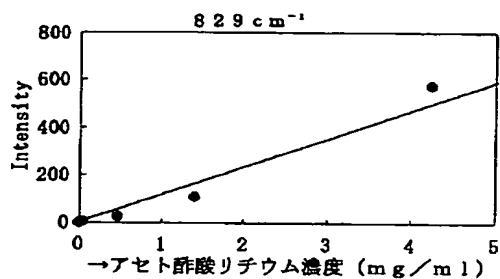
【図 2 8】



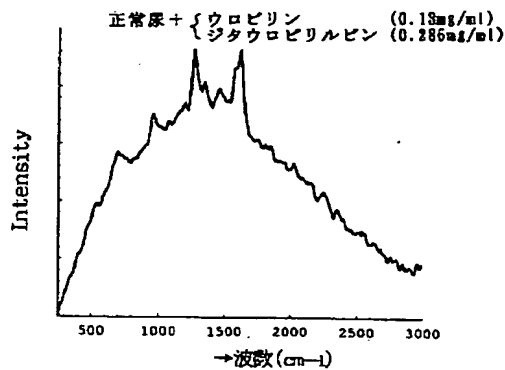
【図 2 9】



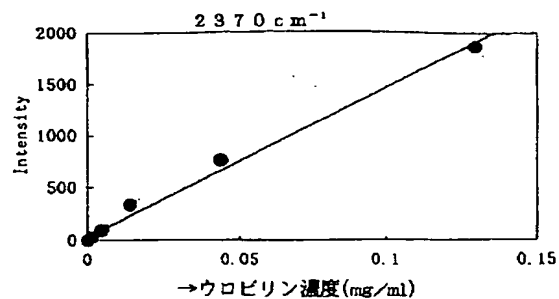
【図 3 0】



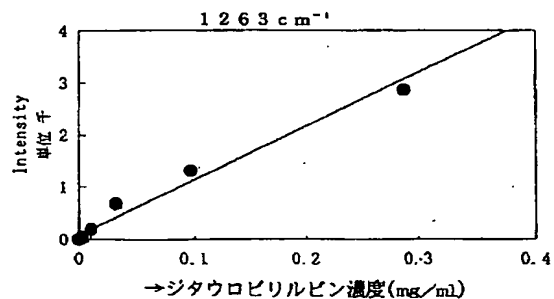
【図 3 1】



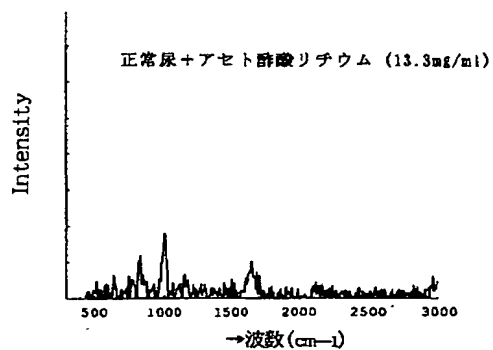
【図 3 2】



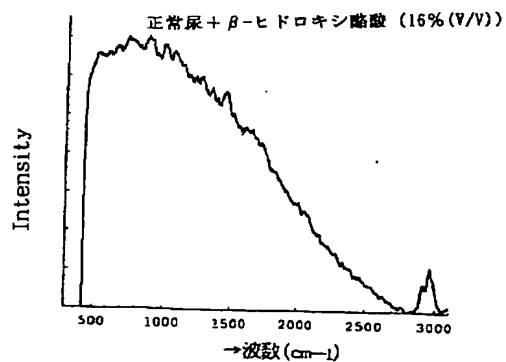
【図 3 3】



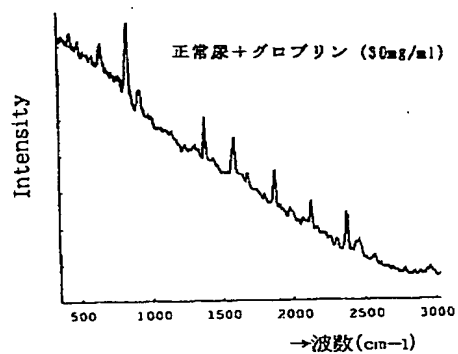
【図 3 4】



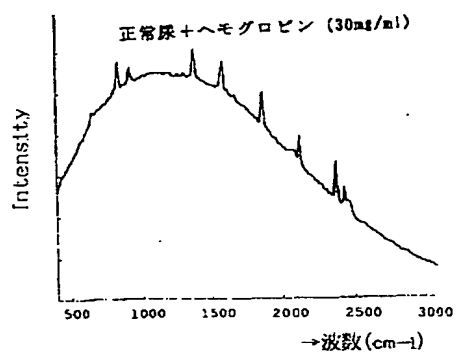
【図 3 5】



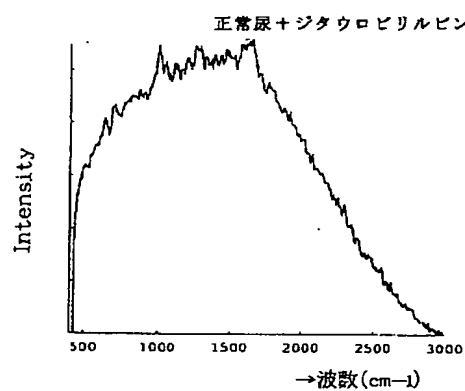
【図36】



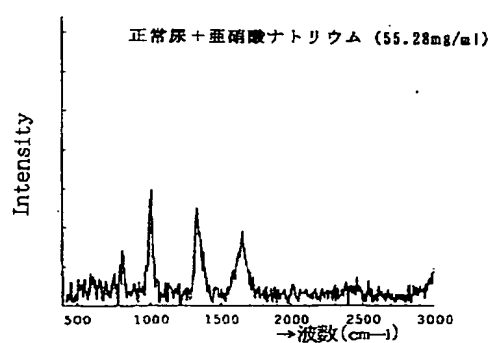
【図37】



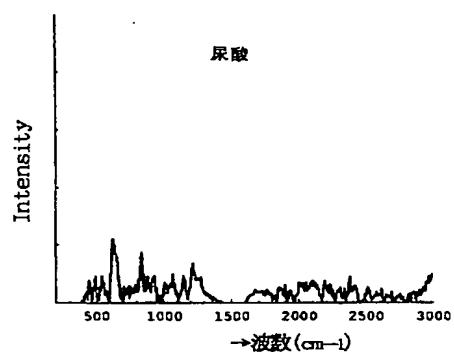
【図38】



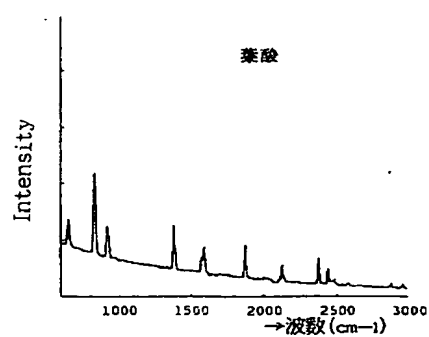
【図39】



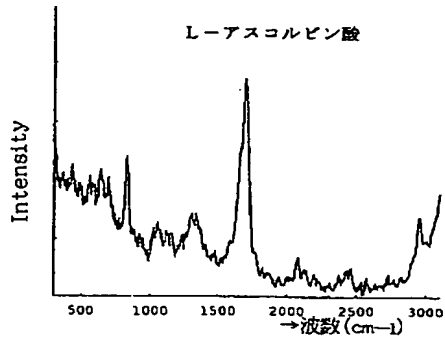
【図40】



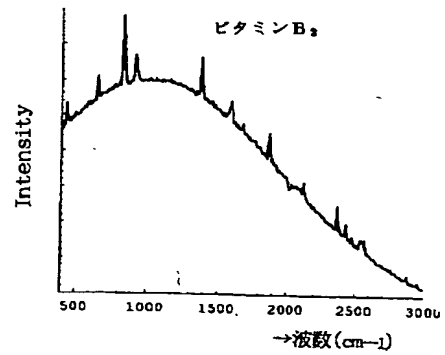
【図41】



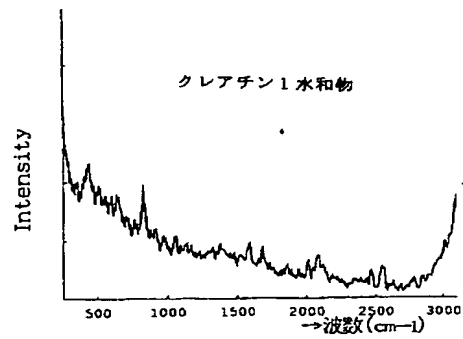
【図 4 2】



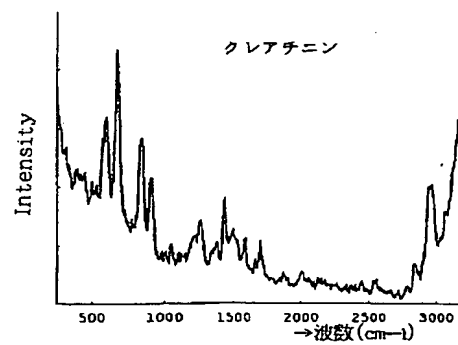
【図 4 3】



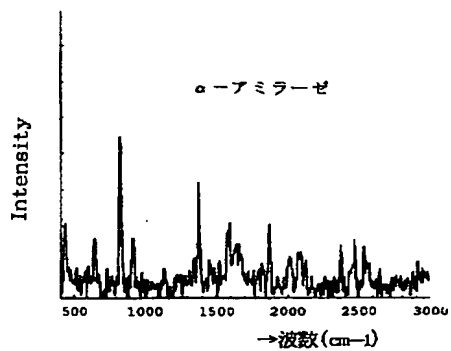
【図 4 4】



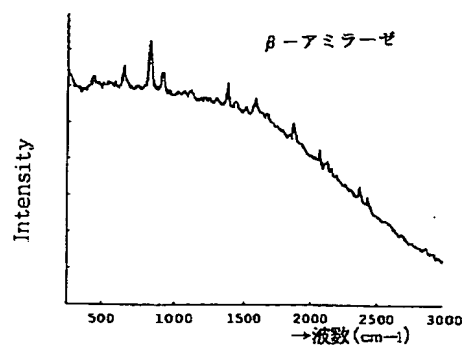
【図 4 5】



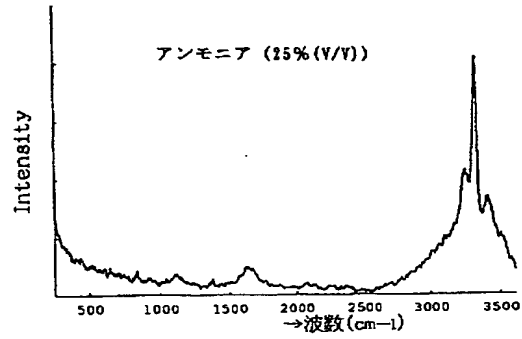
【図 4 6】



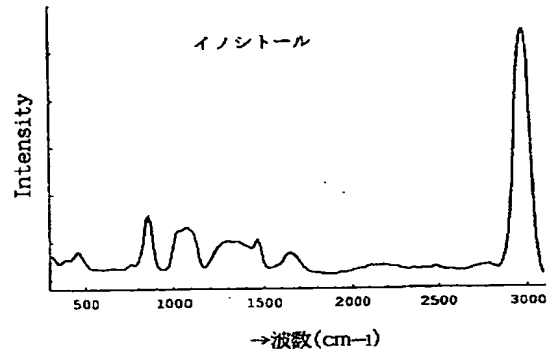
【図 4 7】



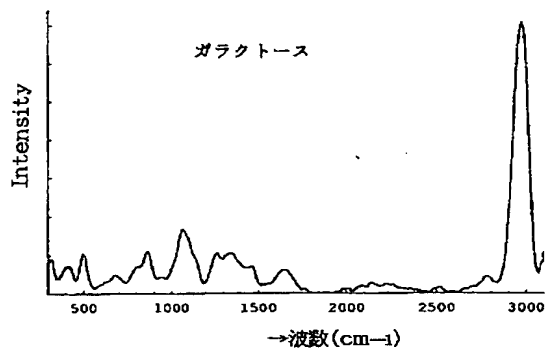
【図 48】



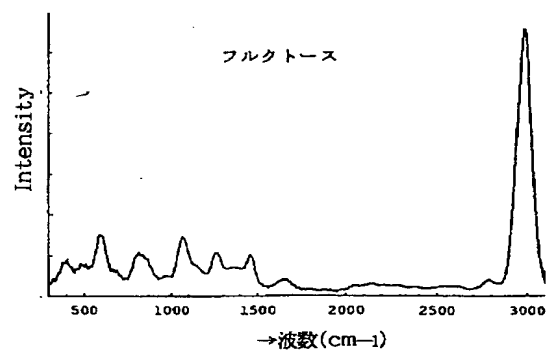
【図 49】



【図 50】



【図 51】



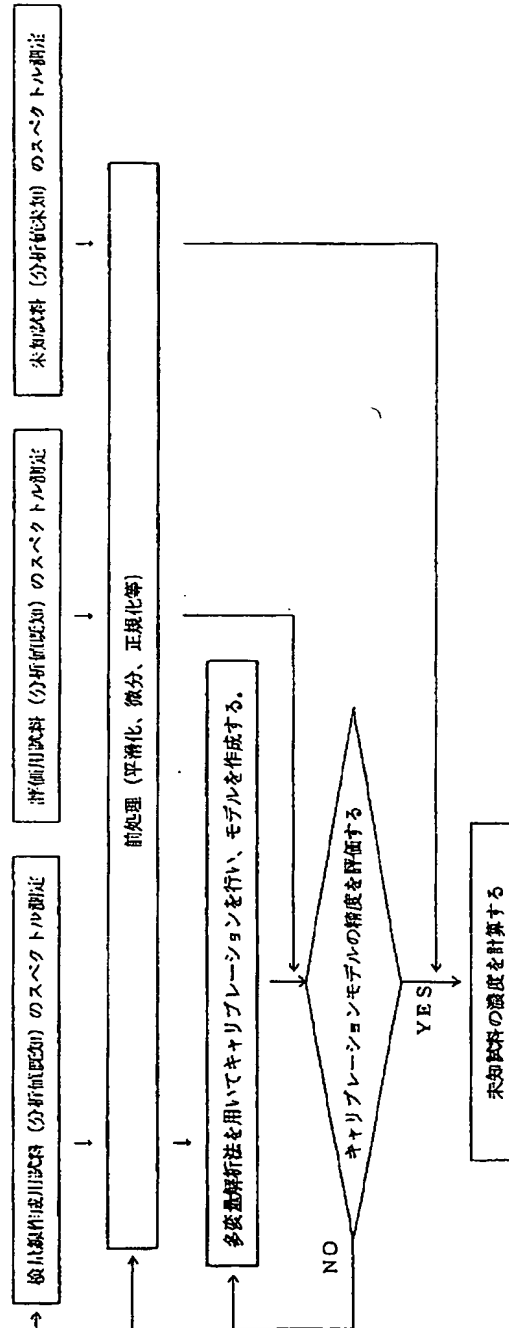
【図 53】

成分	相関係数 R^2
アルブミン	0.999
グロブリン	0.994
ヘモグロビン	0.986
グルコース	0.964
アセト酢酸リチウム	0.998
β -ヒドロキシ酪酸	0.997
アセトン	0.999
ジタウロビリルビン	0.994
ウロビリル	0.994
亜硝酸ナトリウム	0.998
尿素	0.998

【図 52】

ラマン尿検査 (尿中成分検出波数一覧)						
成分	cm ⁻¹	0~1000	1000~1500	1500~2000	2000~2500	2500~
アルブミン		620, 830			2370	
グロブリン	188, 432, 653, 837, 852		1383	1592, 1877	2125, 2370, 2433	
ヘモグロビン	837, 923		1383, 1592	1870	2125, 2370, 2433	
グルコース	405, 524, 648, 779, 840, 914		1054, 1076, 1276, 1346, 1426	1640		2900, 2924
アセト酢酸リチウム		829	1383	1870	2377	2937
β-ヒドロキシ酪酸			1450, 1587, 1630			2900, 2941
アセトン	805		1237, 1429	1710		2941
ジタクロピリルビン	957		1263	1616		
クロピリン					2370	
亜硝酸ナトリウム		813	1348			
尿素	531, 597		1008, 1063, 1168	1613		
尿酸	570					
尿酸	561					
アスコルビン酸	830	846, 931	1385	1592, 1877	2123, 2369, 2430	2949
ビタミンB ₂	434, 655, 828, 890		1347	1576, 1864	2136, 2390, 2449	
クレアチニン・水和物	830			1593		
クレアチニン	568, 610, 695, 847, 898		1051	1576, 1593		2898, 2932, 2966
α-アミラーゼ	423, 561, 822, 898		1363	1576, 1864	2364	
β-アミラーゼ	406, 652, 813, 898		1364	1576, 1864		2695
アンモニア						3220, 3322, 3407

【図54】



【図 5 5】

